# VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE TENAZITÄT FREIER UND ZELLGEBUNDENER ORTHOPOCKENVIREN

GABRIELE KRAATZ

Diss München
1984

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr
Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Prof. Dr. H. Mahnel

# Vergleichende Untersuchungen über die Tenazität freier und zellgebundener Orthopockenviren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Gabriele Kraatz
aus
Mannheim

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

| | |
|---|---|
| Dekan: | Prof. Dr. W. Leidl |
| Referent: | Prof. Dr. H. Mahnel |
| Korreferent: | Prof. Dr. E. Munz |

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

Meiner Familie gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534927_0014

# Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | EINLEITUNG | 7 |
| 2. | SCHRIFTTUM | 9 |
| 2.1 | Allgemeines | 9 |
| 2.1.1 | Einteilung und Aufbau der Pockenviren | 9 |
| 2.1.2 | Widerstandsfähigkeit der Pockenviren | 10 |
| 2.2 | Inaktivierung von freien und zellgebundenen Pockenviren | 11 |
| 2.2.1 | Physikalische Verfahren | 11 |
| 2.2.2 | Chemische Verfahren | 19 |
| 3. | EIGENE UNTERSUCHUNGEN | 27 |
| 3.1 | Material und Methoden | 27 |
| 3.1.1 | Zellkulturen | 27 |
| 3.1.2 | Virus und Nachweis | 28 |
| 3.1.2.1 | Pockenvirusstämme | 28 |
| 3.1.2.2 | Stammsuspensionen von zellfreiem Virus | 29 |
| 3.1.2.3 | Zellsuspensionen mit zellgebundenem Virus | 30 |
| 3.1.2.4 | Qualitativer und quantitativer Virusnachweis | 31 |
| 3.1.3 | Versuchsanordnung | 31 |
| 3.1.3.1 | Verarbeitung der Versuchsproben | 31 |
| 3.1.3.2 | Inaktivierung mit physikalisch-chemischen Mitteln | 33 |
| 3.1.3.3 | Inaktivierung mit viruziden Wirkstoffen | 34 |

Seite

3.2 Versuche und Ergebnisse 35

3.2.1 Inaktivierung zellfreier und zellgebundener Pockenviren durch physikalisch-chemische Verfahren 35

- Thermoresistenz bei 56°C 35
- UV-Empfindlichkeit 40
- pH 3-Stabilität 44

3.2.2 Inaktivierung zellfreier und zellgebundener Pockenviren durch chemische Wirkstoffe 46

- Peressigsäure 47
- Natronlauge 49
- Formalin 51
- N-Cetylpyridiniumchlorid 55
- Chlorbleichlauge 57
- Jodtinktur 59

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 61

5. ZUSAMMENFASSUNG 67

6. LITERATURVERZEICHNIS 69

## 1. E I N L E I T U N G

Unser Wissen über die Widerstandsfähigkeit von Viren gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen basiert überwiegend auf experimentellen Untersuchungen an Viren, suspendiert in verschiedenartigen Medien oder enthalten in festen bis flüssigen tierischen Produkten. Es stützt sich aber auch auf jahrzehntelange Erfahrungen aus der epidemiologischen Beobachtung. Die experimentell gewonnenen Erkenntnisse differieren dabei sehr oft von den empirischen. Viele Virusarten verhalten sich unter natürlichen Bedingungen wesentlich resistenter als unter künstlichen.

Pockenviren erwiesen sich unter Laborbedingungen, soweit untersucht, als nur mäßig widerstandsfähig, wobei fast ausschließlich das Vacciniavirus als Modell diente. Trotzdem weiß man, daß sie unter bestimmten Bedingungen lange infektiös bleiben können. Schon aus dem vorigen Jahrhundert ist belegt, daß Menschen- und Tierpockenviren an Geräten und Futtersäcken selbst unter sehr ungünstigen klimatischen Bedingungen monatelang überdauerten und über weite Entfernungen verschleppt wurden, die menschlichen Blattern z.B. vom Orient nach Europa. Ohne Zweifel war die extreme "Überlebensfähigkeit" durch die Konservierung infolge fester Antrocknung bedingt, aber auch durch den überwiegend zellgebundenen Zustand, in welchem die meisten

DNS-Viren und besonders Pockenviren in vivo vorzugsweise verharren.

Die unterschiedliche Widerstandsfähigkeit von freien suspendierten Pockenviren einerseits und zellgebundenen intrazellulären andererseits darzulegen war Aufgabe dieser Arbeit.

Daneben sollte vor allem untersucht werden, ob einige epidemiologisch bedeutende, in neuerer Zeit wieder in den Vordergrund des Interesse gerückte, auch für den Menschen pathogene Orthopockenviren in ihrer Tenazität mit dem fast ausschließlich geprüften Vacciniavirus im wesentlichen übereinstimmen oder differieren.

# 2. S C H R I F T T U M

## 2.1 Allgemeines

### 2.1.1 Einteilung und Aufbau der Pockenviren

In der Pockenvirusgruppe (Familie Poxviridae) sind zwischen 280 - 400 x 180 - 300 nm große, quaderförmige und komplex aufgebaute Virusarten, die doppelsträngige DNS enthalten, zusammengefaßt. Die Familie ist in 2 Subfamilien und 7 selbständige Genera unterteilt. Das Pockenvirion besteht aus einem Innenkörper, 2 Lateralkörpern und einer äußeren Hülle in Form einer Doppelmembran, in der sich Proteinfilamente in unregelmäßiger, nur beim Genus Parapoxvirus in regelmäßiger kokonartiger Anordnung befinden (DOWNIE and DUMBELL, 1956; HERRLICH, 1967; ROLLE und MAYR, 1978).

Für Tiere und den Menschen pathogene Arten sind in das Genus Orthopoxvirus, mit den untereinander immunologisch eng verwandten Variola-, Vaccinia-, Kuh-, Büffel-, Affen-, Mäuse- und Elefantenpocken, und in das Genus Parapoxvirus, mit den ovoiden etwa 300 x 170 nm großen Ekthyma-, Euterpocken- und Stomatitis papulosa-Viren, eingeordnet (MAYR et al., 1972; FENNER, 1979; MATHEWS, 1982).

### 2.1.2 Widerstandsfähigkeit der Pockenviren

Die Widerstandsfähigkeit (Tenazität) von Viren gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen sowie Methoden der Desinfektion hängt weitgehend von ihrem Aufbau (Strukturproteine, Hülle, Enzyme, Nukleinsäure) ab. Die verschiedenen Virusarten weisen in ihrer Stabilität zum Teil deutliche Unterschiede auf, ebenso Virusarten gleicher Familien (ALBRECHT, 1957; BÖGEL und MAYR, 1962; LIESS, 1974; MAHNEL, 1974; 1979; 1983). Neben ihrer Struktur ist weiterhin der Zustand, in dem Viruspartikel vorliegen, von Bedeutung (MAYR, 1975; ROLLE und MAYR, 1978; MAHNEL, 1983).

An Zellen oder Wirtsprotein gebundenes oder in hoch viskösen Medien suspendiertes Virus wird nach MAHNEL (1979) stark stabilisiert. Zellfrei suspendiert dagegen, ist das Virus vergleichsweise labil. Zur Virusdesinfektion, das heißt zur irreversiblen Beseitigung seiner Infektiosität, sind Veränderungen am Viruspartikel geeignet, die seine Fähigkeit zum Eindringen und zur Vermehrung beeinträchtigen oder aufheben (MAHNEL, 1983). Wird die Virusnukleinsäure geschädigt oder zerstört, ist ein Virus vermehrungsunfähig. Eine Vermehrung ist auch dann nicht möglich, wenn Viruskomponenten, die für eine Haftung und ein Eindringen des Virus in die Zelle und somit für den Start seiner Vermehrung nötig sind, zerstört oder verändert werden.

## 2.2 Inaktivierung von freien und zellgebundenen Pockenviren

### 2.2.1 Physikalische Verfahren

Über die viruzide Wirksamkeit chemischer und physikalischer Inaktivierungsverfahren auf zellfreie Viren, speziell auf das Vacciniavirus als am meisten und besten untersuchtem Vertreter der Pockenvirusgruppe, liegen zahlreiche Untersuchungen vor (GILDEMEISTER et al., 1930; DUNHAM, 1943; GROUPÉ et al., 1955; ANGELOFF et al., 1956; KAPLAN, 1958; WOODROOFE, 1960; GALASSO and SHARP, 1963; BINGEL und HERMANN, 1966; KEWITSCH und WEUFFEN, 1970; MAHNEL, 1974; KUNZ, 1974; MAHNEL und HERLYN, 1976; MAHNEL und KUNZ, 1976; MAHNEL, 1977; BRODOROTTI, 1978; MAHNEL, 1978; MAHNEL et al., 1980; MAHNEL und BRODOROTTI, 1981; BRODOROTTI und MAHNEL, 1982; MAHNEL, 1983).

Als physikalisches Inaktivierungsverfahren wurde Wärme bzw. Hitze unterschiedlicher Temperaturen herangezogen (FENNER, 1958; KAPLAN, 1958; WOODROOFE, 1960; GINOZA, 1968; LARKIN, 1977; MAHNEL, 1977, 1979; MAHNEL und BRODOROTTI, 1981). Pockenviren sind thermolabil und bei Erwärmung über 50°C auch in höheren Konzentrationen unterschiedlich rasch in Minuten bis Stunden inaktivierbar (FENNER, 1958; KAPLAN, 1958; LARKIN, 1977; MAHNEL, 1979).

Der Wirkungsmechanismus der Hitze steht in direktem Zusammenhang mit der chemischen Zusammensetzung der Viruspartikel. Verändert werden die chemischen Bestandteile Lipide, Proteine und Nukleinsäuren (WOESE, 1960). Temperaturen um 50°C denaturieren die Virusproteine, wobei diese Wirkung mit steigenden Temperaturen zunimmt (LARKIN, 1977). Die Inaktivierung erfolgt seiner Meinung nach dadurch, daß die Virusnukleinsäure aus dem Virion frei wird und ins umgebende Medium übertritt. Sind Nukleasen anwesend, wird die Nukleinsäure dann rasch zerstört. Ist dies nicht der Fall, soll nach LARKIN die freie Virusnukleinsäure infektiös bleiben können.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Versuche zur Hitzeinaktivierung von Pockenviren wurden meistens mit hochtitrigem Virus durchgeführt, wobei die Viren überwiegend in Röhrchen und suspendiert in Pufferlösungen vorlagen und in einem temperaturkonstanten Wasserbad inkubiert wurden (FENNER, 1958; KAPLAN, 1958; LARKIN, 1977; MAHNEL, 1979).

Erste Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Vacciniavirus-Stämme liegen von FENNER und KAPLAN aus dem Jahre 1958 vor. Bei einer konstant gehaltenen Temperatur von 55°C stellte FENNER nach einem Zeitraum von 40 Minuten einen deutlichen Abfall des Gehalts an infektiösem Virus von 2 bis 5 Zehnerpotenzen fest. KAPLAN beobachtete, daß

eine Hitzeinaktivierung von Vacciniavirus bei Temperaturen zwischen 55°C und 60°C nicht einer Reaktion erster Ordnung entspricht, wie es HIATT (1964) beschreibt. Er kommt zu der Ansicht, daß die Viruspopulation in ihrer Hitzeempfindlichkeit heterogen ist. Dafür spricht, daß scheinbar zunächst die thermolabilen Partikel rascher temperaturabhängig inaktiviert wurden gefolgt von einer Inaktivierung mit konstant geringerer Geschwindigkeit, die temperaturabhängig ist und eine Fraktion hitzeresistenter Viruspartikel in der Suspension vermuten läßt. WOESE bestätigte 1960 die Hypothese der Temperaturabhängigkeit der Viruspartikel.

Auch in Untersuchungen von GALASSO und SHARP (1963; 1963 a) fiel der Gehalt an Vacciniavirus bei einer Temperatur von 56°C innerhalb von 45 Minuten um mehr als 4 Zehnerpotenzen ab. Der Abfall der Infektiosität stimmt mit den Untersuchungen von WOODROOFE (1960) überein, wobei die Autoren sich darüber einig sind, daß nicht nur eine temperaturabhängige Inaktivierung erfolgt, sondern daß die Geschwindigkeit des Virusabfalls von der Qualität des entsprechenden Virusstammes abhängig ist. Virus "minderer" Qualität zeigt nach ihrer Auffassung eine wesentlich ausgeprägtere Empfindlichkeit gegenüber Wärmeeinflüssen.

Nach LARKIN (1977) wird eine Hitzeinaktivierung von Vacciniavirus (Abfall um ca. 5 Zehnerpotenzen) bei einer

Temperatur von 56°C nach 30 Minuten erzielt. Seiner Auffassung nach ist die benötigte Zeit abhängig von der Menge virusumhüllender Substanzen, die somit eine Inaktivierung erschweren, und von der ursprünglichen Partikelanzahl pro ml, da ein höherer Nukleinsäureanteil auch eine längere Einwirkung der Noxe erforderlich macht. Untersuchungen bei 55°C oder 57°C wurden auch von HARPER et al. 1978 vorgenommen. Es wurde das Verhalten der einzelnen Bestandteile von Vacciniavirus gegenüber Wärme untersucht. Nach 30 Minuten bei 57°C sank der Gehalt an infektiösen Einheiten um 3 Zehnerpotenzen ab. Die Untersuchung der Einzelbestandteile ergab, daß die allgemeinen Aktivitäten zahlreicher Viruspartikel-Funktionen abnahmen (DNA-abhängige RNA Polymerase und RNAmethylase) und somit die Infektiosität der Viruspartikel herabgesetzt wurde. Weitere Untersuchungen von WALLIS et al. (1962), MAHNEL (1979) sowie MAHNEL und BRODOROTTI (1981) bestätigten die Thermolabilität von Vacciniavirus als Vertreter der Pockenvirusgruppe.

WALLIS untersuchte den Einfluß von Kationen und Glycerin auf die Wärmeresistenz von Vacciniavirus, wobei Natrium bei 50°, 37° und 25°C einen stark virusstabilisierenden Effekt zeigte, ein 50 %iger Glycerinzusatz aber nur bei 50°C stabilisierend wirkte. Die Anwesenheit von Magnesium- und Calciumionen bewirkte eine raschere Inaktivierung in den erwähnten Temperaturbereichen. Als Vergleich

diente in Wasser suspendiertes Virus, das bei 50°C nach 4 Stunden, bei 37°C nach 4 Tagen und bei 25°C nach 10 Tagen mehr als 6 Zehnerpotenzen an Infektiosität verlor.

Die zitierten Untersuchungen beziehen sich ausschließlich auf zellfrei suspendiertes Virus. Pockenviren liegen jedoch zum Großteil zellgebunden vor (Krusten, abgestoßene Zellen). Deshalb sind besonders Untersuchungen mit an Zellen gebundenem Virus von Interesse.

Einige wenige Desinfektionsversuche, die mit Pockenkrusten durchgeführt wurden, sind kaum miteinander vergleichbar (GILDEMEISTER et al., 1930; GROSSGEBAUER et al., 1975; SCHÜMANN und GROSSGEBAUER, 1977).
Neuere Erkenntnisse bezüglich der Thermostabilität stammen von SCHÜMANN und GROSSGEBAUER (1977). Ihre Untersuchungen beziehen sich auf die Wirkung von Wärme auf das Vacciniavirus, eingebettet in Kaninchenborken oder in menschlichen Hautepithelzellen. Eine vollständige Inaktivierung der Vacciniavirus-haltigen Borkenstückchen trat nur bei den Proben auf, die 1 Stunde bei 90°C inkubiert und in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert worden waren.

Als weiteres physikalisches Mittel zur Virusinaktivierung hat man Strahlen unterschiedlicher Wellenlänge verwendet. Versuche wurden einerseits mit ionisierenden Strahlen

sehr kurzer Wellenlänge ($10^{-16}$ bis $10^{-11}$ m), wie Gammastrahlen, Röntgenstrahlen und Alpha-Strahlung, die als energiereiche elektromagnetische Strahlen radioaktiver Substanzen und bei Atomreaktionen ausgesendet werden, durchgeführt (EPSTEIN, 1953; MC CREA et al., 1960; BRODOROTTI, 1978; MAHNEL, 1979; MAHNEL et al., 1980), andererseits mit nichtionisierenden Strahlen, wie Ultraviolettlicht verschiedener Wellenlängen ( 280 - 400 nm) (BEUKERS and BERENDS, 1961; GALASSO and SHARP, 1963; RAUTH, 1965; DERTINGER und JUNG, 1969; BRODOROTTI und MAHNEL, 1982) sowie mit Mikrowellen (MAHNEL und BRODOROTTI, 1981).

Frühere Autoren (BEUKERS and BERENDS, 1961; TERZI, 1961; RAUTH, 1965; GINOZA, 1968; DERTINGER und JUNG, 1969) sahen einen direkten Zusammenhang zwischen der Strahlenempfindlichkeit gegenüber ULTRAVIOLETTLICHT und der Art der Virusnukleinsäure (ein- oder doppelsträngig, DNA oder RNA und Molekulargewicht). So stellten RAUTH 1965, GINOZA 1968 und DERTINGER und JUNG 1969 eine höhere UV-Resistenz der Viren mit doppelsträngiger gegenüber denen mit einsträngiger Nukleinsäure fest. Nur die Pockenviren verhielten sich nach BRODOROTTI und MAHNEL (1982) abweichend stark labil. Daher wird von den Autoren angenommen, daß eine Schädigung anderer, für die Vermehrung notwendiger Viruskomponenten erfolgt. UV-Licht der Wellenlänge 254 nm

vermochte Vacciniavirus als Vertreter der Pockenviren schon nach 20 Sekunden in Trinkwasser zu inaktivieren (BRODOROTTI und MAHNEL, 1982).

Bezüglich der Kinetik der UV-Inaktivierung von Pockenviren sind die Angaben in der Literatur widersprüchlich. Es wurden überwiegend asymptotische Inaktivierungsabläufe festgestellt und mögliche Reaktivierungen diskutiert (BEUKERS und BERENDS, 1961; ABEL, 1962; JOKLIK, 1964). Nach BRODOROTTI und MAHNEL (1982) soll die Inaktivierung im Sinne einer Reaktion 1. Ordnung ablaufen, wenn mäßige Viruskonzentrationen und pH-Werte über 7,0 vorliegen. Zu einer Reaktivierung kommt es ihrer Meinung nach nicht.

GAMMASTRAHLEN und ihre Wirkung auf Vacciniavirus untersuchten MC CREA 1960, GINOZA 1968 und MAHNEL et al. 1980. MC CREA stellte 1960 fest, daß eine Bestrahlung (Dosis nicht definiert) auf angetrocknetes Vacciniavirus deutlich schädigend wirkte (80 % Reduktion). Die virusschädigende Wirkung der Gammastrahlen soll nach Untersuchungen von BOLING und RANDOLPH 1977 nicht nur auf die Nukleinsäure, sondern auch auf das Virusprotein erfolgen. Auch MAHNEL et al. erklären sich die starke Labilität von Pockenviren gegenüber Gammastrahlen dadurch, daß auch andere Viruskomponenten außer der Nukleinsäure geschädigt werden. Sie konnten in ihren Untersuchungen 1980 keinen direkten Zusammenhang zwischen der Art der Nukleinsäure

verschiedener Virusarten und deren Strahlenempfindlichkeit erkennen. Hühnerpockenviren ließen sich mit der Dosis von 1400 krad schnell inaktivieren (BRODOROTTI, 1978). Die Kinetik der Inaktivierung von suspendiertem Virus erfolgte nach einer Reaktion 1. Ordnung (MAHNEL et al., 1980).

Praktisch alle beschriebenen Versuche bezüglich UV-Inaktivierung wurden an hochkonzentrierten Virussuspensionen vorgenommen, das heißt, daß eine zuverlässige Inaktivierung nur dann erfolgte, wenn die Strahlungsenergie die Flüssigkeit mit ausreichender Intensität durchdringen konnte (LIEBERMANN, 1967). Eine Abnahme der Lichttransmission von 90 % auf 75 % hat nach MÜLLER (1974) eine Abnahme der Desinfektionsleistung von 99 % auf 97,5 % bis 88 % zur Folge.

Daher bleibt nach OTTIS (1976) und MAHNEL (1983) die Anwendung von UV-Strahlen zur Virusinaktivierung wegen ihrer geringen Tiefenwirkung auf Medien geringer Schichtdicke wie Luft, reines Wasser, glatte Oberflächen begrenzt. Eine sehr gute Tiefenwirkung aber entfalten nach MAHNEL (1983) die Gammastrahlen, wobei aber auch ihre Einsatzmöglichkeiten auf wenige Gebiete, wie etwa die Abwässer- und Klärschlammsanitation beschränkt bleiben (BRODOROTTI und MAHNEL, 1980).

Untersuchungen über an Zellen gebundene Pockenviren liegen bezüglich Strahleninaktivierung bisher nicht vor.

### 2.2.2 Chemische Verfahren

Die Labilität von Viren gegenüber bestimmten Chemikalien wird vor allem bei ihrer Inaktivierung und Desinfektion genutzt (WILLINGER und THIEMANN, 1972). Nach MAHNEL (1983) erfolgt die chemische Inaktivierung aufgrund einer direkten Reaktion mit der Virusnukleinsäure, dem Virusprotein und/oder Bestandteilen der Hülle. Es kommt dadurch zu einer Strukturänderung der infektiösen Partikel und zum Verlust ihrer Vermehrungsfähigkeit.

Nach SPICHER (1973) sind 2 Hauptfaktoren für die Inaktivierung von Mikroorganismen entscheidend:

1. Die Wirkungsbedingungen (Konzentration, Temperatur, Einwirkungsdauer, pH-Wert und umgebendes Milieu);
2. die Widerstandsfähigkeit der Mikroorganismen als solche.

Die bisher vorliegenden Berichte über die Inaktivierung und Desinfektion von Viren mittels Chemikalien sind ebenso zahlreich wie verwirrend. So lassen sich nur die wenigen Untersuchungen, die unter zumindest sehr ähnlichen Versuchsbedingungen und mit gleichen Testmodellen vorgenommen wurden, miteinander vergleichen (SPICHER, 1970).

Viele Prüfungen beziehen sich auf FORMALIN (Verdünnungen der 35 %igen Formaldehydlösung) und seine Wirkung auf das Vacciniavirus in Suspension oder an Zellen gebunden. GILDEMEISTER et al. untersuchten 1930 die Wirkung von 0,5 % Formalin auf das Vacciniavirus und auf virushaltige Borken. 15 Minuten Einwirkungszeit genügten zur vollständigen Inaktivierung von suspendiertem Virus, auf Virus in Borken mußte dagegen eine 2 %ige Lösung 60 Minuten einwirken, um eine quantitativ signifikante Inaktivierung zu erreichen. Untersuchungen von ALBRECHT (1957) beziehen sich auf Formalin in 1,5 %iger Konzentration und dessen Wirkung auf Mäusepocken. Der Restvirusnachweis erfolgte im Tierversuch und ergab einen Abfall des Virusgehalts um mehr als 4 Zehnerpotenzen nach 30 Minuten.

BINGEL und HERMANN stellten 1966 eine Viruzidie des 0,5 %igen Formalins auf Vacciniavirus im Suspensionsversuch nach 15 Minuten Einwirkungsdauer fest. KEWITSCH und WEUFFEN (1970) berichten von einer inaktivierenden Wirkung nach 4 Minuten, wenn 2 %iges Formalin einwirkte. Untersuchungen mit Vacciniavirus - hier in Leitungswasser - liegen von MAHNEL und HERLYN (1976) vor. Formalin nach DAB 7 senkte bei einer Temperatur von 8° bis 10°C 0,5 %ig nach einer Stunde den Virusgehalt um circa 3 Zehnerpotenzen.

HENNEBERG und HÖPPNER wählten 1960 ebenfalls Formalin in einer Konzentration von 0,5 % zur Inaktivierung von auf Batistläppchen partiell angetrocknetem Vacciniavirus. Die inaktivierende Wirkung trat nach 2 - 5 Minuten ein. MAHNEL und KUNZ untersuchten 1976 die Wirkung von Formalin auf Vacciniavirus an Keimträgern (Verbandsmull, Eischale, Holzspäne, Zementplättchen). Eine 2 %ige Lösung wirkte je nach Trägerart z.T. erst nach 2 Stunden ausreichend viruzid (Abfall des Virusgehalts um mehr als 4 Zehnerpotenzen).

Bezüglich der Wirkung von Formalin auf zellgebundenes Virus liegen Untersuchungen von SCHÜMANN und GROSSGEBAUER (1977) vor. Die Ergebnisse beziehen sich auf Vacciniavirus-haltige Pockenkrusten (-borken), die von menschlicher Haut oder von Kaninchenhaut gewonnen wurden. Die Autoren stellten fest, daß eine 0,5 %ige Lösung nach 6 Stunden, eine 1 %ige nach 2,5 Stunden und eine 2 %ige nach 1,5 Stunden inaktivierend wirkt, wobei die Wirkung von der Qualität der Borken, insbesondere von deren Dicke (evt. differierender Virusgehalt) abhängt.

Anfang des 20. Jahrhunderts wies FREER (1902) auf die antimikrobiellen und sporiziden Eigenschaften der PERESSIGSÄURE hin. Zahlreiche nachfolgende Untersuchungen haben inzwischen gezeigt, daß geringe Konzentrationen dieser Persäure innerhalb kurzer Zeit eine bakterizide, fungizide und virusinaktivierende Wirkung besitzen

(BRIEFMAN-KLINE and HULL, 1960; SPRÖSSIG et al., 1967; SPRÖSSIG und MÜCKE, 1968; SPRÖSSIG; 1979).

Nur SPRÖSSIG und MÜCKE haben auch ein Pockenvirus geprüft. Sie beschrieben 1968 eine hohe Empfindlichkeit des Vacciniavirus gegenüber 0,2 %iger Peressigsäure. In dieser Konzentration wird das Virus innerhalb von 2 Minuten zu 99,99 % inaktiviert, ebenso wenn der Peressigsäure 33 % Propylalkohol zugesetzt wurde (SPRÖSSIG und MÜCKE, 1964; 1965 und 1968). Desinfektionsversuche wurden in noch zellhaltigem Überstand hochtitriger Virusansätze vorgenommen. Die sehr intensive und breit antimikrobielle Wirkung der Peressigsäure soll nach KOCH et al. (1966), SPRÖSSIG et al. (1967) und TICHAČEK (1972) auf ihr hohes Oxydationspotential zurückzuführen sein, wobei der sauren Reaktion noch eine unterstützende Wirkung zukommt. Die durch die Peressigsäure erzielte oxydative Virusinaktivierung ist nach SPRÖSSIG und MÜCKE (1968) irreversibel, da auch durch Zugabe von Reduktionsmitteln keine Reaktivierung der Viren erfolgte.

Der Einfluß des PH-WERTES spielt ebenfalls eine große Rolle (ROLLE und MAYR, 1978). Das Vacciniavirus im speziellen ist bei einem pH-Wert von 3 labil (MAYR et al., 1982).

Die viruzide Wirkung von JOD beschrieb GERSHENFELD 1955. Jod als ein Vertreter der Halogene besitzt ein starkes

Oxidationsvermögen, wobei die viruzide Wirkung nach EGGENSPERGER (1973) und APOSTOLOV (1980) auf der direkten Reaktion mit Aminogruppen der Virusproteine im Sinne einer Halogenisierung beruht. In reinem Wasser erfolgt eine Inaktivierung von 1000 $KID_{50}$ pro ml Vacciniavirus bei einer Konzentration von 1 mg Jod pro Liter Wasser nach 15 Minuten bei Raumtemperatur (MAHNEL, 1977; 1979). Allerdings ist die Wirkung des Jods nur in einem reinen Milieu zuverlässig. Durch organische wie anorganische Bestandteile wird es sonst bevorzugt gebunden.

Denselben Nachteil, Chlorzehrung genannt, haben CHLOR und z.T. andere Chlorverbindungen (SPICHER, 1970; THRAENHART und KUWERT, 1975). Das Wirkungsprinzip von Chlor und seinen Verbindungen beruht nach EGGENSPERGER (1973) auf der Bildung von unterchloriger Säure in wässriger Lösung. Diese wirkt rasch und intensiv solange nicht Verunreinigungen eine zuverlässige Inaktivierung in Frage stellen. Untersuchungen liegen über die Wirkung von Chlor, als freies Chlor, Hypochlorit und als andere aktives Chlor abspaltende Verbindungen, vor (OTTIS, 1976; MAHNEL, 1977; MAYR et al., 1980). Vacciniavirus-haltiges Trinkwasser mit Zusatz von 0,1 bis 0,5 mg/l freiem Chlor wies nach 2 Stunden Einwirkungsdauer immer noch einen relativ hohen Virusgehalt auf (OTTIS, 1976). Die Reduktion des Virusgehalts betrug bei 0,1 mg/l Chlor nur 0,25 log10, bis zu 2,5 Zehnerpotenzen bei 0,5 mg/l freiem Chlor.

Untersuchungen von MAYR et al. (1980) beziehen sich auf die Wirkung des Natriumhypochlorit-haltigen Mittels "Maranon H". Mit Vacciniavirus kontaminierte Zahnprothesen wurden bis zu 30 Minuten in eine 0,5 %ige Desinfektionslösung eingelegt, wobei der Virusgehalt rapide absank (mehr als 5 Zehnerpotenzen).

Über die Wirkung ionogener GRENZFLÄCHENAKTIVER VERBINDUNGEN liegen die unterschiedlichsten Aussagen vor. Zur Virusinaktivierung werden kationische Verbindungen, sogenannte Invertseifen verwendet (BINGEL und HERMANN, 1966). Bekannt sind vor allem die quaternären Ammoniumverbindungen. Sie sollen nur auf behüllte Viren, bedingt durch deren Aufbau, eine Wirkung zeigen (MAHNEL, 1983).

Die unterschiedlichen Aussagen bezüglich ihrer Wirkung hängen auch mit der Wahl des jeweiligen Präparates zusammen.

So wirkte die Invertseife Zephirol "nur wenig" auf das Vacciniavirus (LEHMANN, 1939). BINGEL und HERMANN (1966) dagegen haben mit der Invertseife Quartamon 0,9 %ig innerhalb von 2 Minuten einen deutlichen Abfall des Virusgehaltes um ca. 4 Zehnerpotenzen beschrieben. KEWITSCH und WEUFFEN erzielten 1970 mit 1,5 % "$C_4$" nach einer Minute und mit "Fesia-mon" nach 16 Minuten eine Inaktivierung von Vacciniavirus im Suspensionsversuch. SCHÜMANN

und GROSSGEBAUER (1977) verwendeten das Präparat "Killavon" 10 %ig. Vacciniavirus in Borkenstückchen von Kaninchenhaut ließ sich aber damit nach 18 Stunden nicht vollständig inaktivieren.

Auch die NATRONLAUGE wird schon seit Jahrzehnten in der Bekämpfung virusbedingter tierischer Seuchen eingesetzt. Untersuchungen über Konzentration und Wirkung beziehen sich vorwiegend auf Stall- und Flächendesinfektion. Als stark viruzide Lauge wirkt sie nach Untersuchungen von MAHNEL und HERLYN (1976) auf kleine und nackte Viren in einer Konzentration von 2 %. In Bezug auf behüllte Viren, besonders Vacciniavirus, stellten die Autoren eine gute viruzide Wirkung bei einer Konzentration von 0,3 und 0,5 % fest, wenn die Einwirkungsdauer 1 Stunde und die Temperatur 8° - 10°C betrug.

Abkürzungen

Im Kapitel 3 - eigene Untersuchungen - werden folgende Abkürzungen benutzt:

| | | |
|---|---|---|
| AP | - | Affenpocken-Virus |
| AP-f | - | freies Affenpocken-Virus |
| AP-g | - | zellgebundenes Affenpocken-Virus |
| BEL | - | embryonale Rinderlungen |
| cpE | - | cytopathischer Effekt |
| EP | - | Elefantenpocken-Virus |
| EP-f | - | freies Elefantenpocken-Virus |
| FRS | - | Fetales Rinderserum |
| HEF | - | Hühnerembryofibroblasten |
| KP | - | Kuhpocken-Virus |
| KP-f | - | freies Kuhpocken-Virus |
| LA | - | Lactalbumin |
| MP | - | Mäusepocken-Virus |
| MP-f | - | freies Mäusepocken-Virus |
| Ph | - | Phenolrot |
| RAF | - | Rinderamnionflüssigkeit |
| StP | - | Stomatitis papulosa-Virus |
| StP-f | - | freies Stomatitis papulosa-Virus |
| Vacc | - | Vacciniavirus |
| Vacc-f | - | freies Vacciniavirus |
| Vacc-g | - | zellgebundenes Vacciniavirus |
| MEM | - | Minimal Essential Medium |
| PBS | - | phosphatgepufferte Kochsalzlösung |

# 3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

## 3.1 Material und Methoden

### 3.1.1 Zellkulturen

Für die Vermehrung und den Nachweis der verschiedenen Orthopockenviren dienten Zellkulturen aus embryonalen Rinderlungen (BEL) und aus Hühnerembryonen (HEF).

Hühnerembryofibroblastenzellen wurden aus 10 bis 11 Tage vorbebrüteten Hühnerembryonen nach der Methode von MAYR und KALCHER (1960), embryonale Rinderlungenzellen nach der Methode von MADIN et al. (1957) aus Rinderembryonen gewonnen. Von BEL- und HEF-Primärkulturen wurden nach Bedarf auch Subkulturen angelegt.

Das Anzuchtmedium für BEL-Zellkulturen bestand aus
Eagles Minimal Essential Medium (MEM) mit einem Anteil von 1,3 % Natriumbicarbonatlösung,
5 % fetalem Rinderserum (FRS)
und Antibiotika (100 I.E. Penicillin und 100 γ Streptomycin pro ml).

Das Erhaltungsmedium enthielt nur 2 % FRS.

Das Anzuchtmedium für HEF-Zellkulturen setzte sich zusammen aus
78,5 % Earle'scher Salzlösung

10 % fetalem Rinderserum (FRS)
10 % hydrolisiertem Lactalbumin
(in 5 %iger Lösung) (LA)
1,5 % Phenolrot (in 1 %iger Lösung) (Ph)
und Antibiotika (100 I.E. Penicillin
und 100 γ Streptomycin pro ml).

Als Erhaltungsmedium diente reine geklärte Rinderamnionflüssigkeit (RAF), der 1,5 % Phenolrotlösung und Antibiotika (s.o.) zugesetzt wurden.

### 3.1.2 Virus und Nachweis

#### 3.1.2.1 Pockenvirusstämme

Die experimentellen Untersuchungen wurden mit folgenden Pockenvirusarten durchgeführt:

Vaccinia (Vacc) - Virus (Orthopoxvirus commune),
Stamm Elstree, Kulturvirus der 7. Passage in BEL-Kulturen.

Kuhpocken (KP) - Virus (Orthopoxvirus bovis),
Stamm Brighton, Kulturvirus der 2. Passage in BEL-Kulturen.

Affenpocken (AP) - Virus (Orthopoxvirus simiae),
Stamm "von Magnus" (Kopenhagen), Kulturvirus der 11. Passage in HEF-Kulturen.

Elefantenpocken (EP) - Virus (Orthopoxvirus elefanti),
Stamm München 1, Kulturvirus der 11. Passage in HEF-Kulturen.

Mäusepocken (MP) (Ektromelie) - Virus (Orthopoxvirus muris),

Stamm München 1, Kulturvirus der 5. Passage in HEF-Kulturen.

Stomatitis papulosa (StP) - Virus (Parapoxvirus bovis 1),

Stamm V660/74, Kulturvirus der 3. Passage in BEL-Kulturen.

3.1.2.2 Stammsuspensionen von zellfreiem Virus

Die Suspensionen wurden bei KP- und StP-Virus aus BEL-Primärkulturen, bei den restlichen Orthopockenviren aus HEF-Primärkulturen gewonnen. Dichtgewachsene HEF- bzw. BEL-Kulturen in Roux-Flaschen wurden mit Erhaltungsmedium beschickt, mit etwa $10^7$ $KID_{50}$ Virus pro Flasche infiziert und bei 37°C weiterbebrütet. Nach Ausbildung eines cytopathischen Effektes (cpE) von etwa 90 % wurde das Virus geerntet. Über ein Gefriertauen (-70°C) wurde die Kultur aufgeschlossen, die Virus-Zellsuspension dann 2 Minuten mit Ultraschall bei 200 - 250 Watt pulsierend behandelt (Branson Sonifier B12), Zellreste anschließend abzentrifugiert (1500 UpM, 10 Minuten), der Überstand als jeweilige Virus-Stammsuspension in Mengen von 2 ml abgefüllt und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

3.1.2.3 Zellsuspension mit zellgebundenem Virus

In Kulturflaschen dichtgewachsene Zellkulturen wurden unter einem Virus-Zellverhältnis von ca. 1 mit Pockenviren infiziert und bei 37°C weiterbebrütet. Beim Erscheinen erster geringfügiger cpE wurde die Mediumphase entfernt, die Zellagen zweimal mit PBS gründlich gewaschen (Entfernen des freien Virus), die Kulturzellen dann mit Trypsinlösung abgelöst und fein suspendiert und durch niedertourige Zentrifugation sedimentiert. Dieses Sediment virushaltiger noch intakter Zellen - es enthält bei Pockenviren 90 % des Nachkommenvirus - wurde dann durch Resuspendierung in PBS und erneute Zentrifugation ein weiteres Mal gewaschen und dann in einem kleineren Volumen Kulturmedium (MEM) ohne Serumzusatz suspendiert.

Diese Suspensionen von intakten virushaltigen Zellen bildeten die Vergleichsbasis von "zellgebundenem Virus" zum freien Virus der Stammsuspensionen in den vergleichenden Testen. Sie wurden unmittelbar vor Ansatz von Inaktivierungsversuchen immer frisch hergestellt und innerhalb 1 Stunde verarbeitet.

Der Zeitpunkt nach der Infektion der Zellen für ihre Gewinnung, d.h. wann vor Eintritt cytopathischer Läsionen in den Zellen ein optimaler Virusgehalt vorliegt, war bei den einzelnen Pockenvirusarten sehr unterschiedlich und wurde in Vorversuchen ermittelt.

3.1.2.4 Qualitativer und quantitativer Virusnachweis

Der qualitative Virusnachweis erfolgte bei allen Orthopockenviren, außer MP-Virus, sowie beim StP-Virus anhand des eindeutig ausgeprägten und fortschreitenden cpE in Röhrchenkulturen subkultivierter BEL-Zellen. Die cpE waren ab 1. bis 2. Tag p.inf. (Vacc-, KP-, EP-Virus) oder etwas später ab 2. bis 4. Tag p.inf. (AP- und StP-Virus) diagnostisch verwertbar.

Das MP-Virus wurde in HEF-Röhrchenkulturen anhand des cpE, der sich ab 3. Tag p.inf. bis zum 7. Tag gut ausbildet, nachgewiesen.

Die Bestimmung des Virusgehalts in Virussuspensionen und Proben erfolgte über die Titrierung in Zehnerpotenzen, Verimpfung der Verdünnungsstufen auf je 4 Kulturröhrchen (à 0,1 ml), Auswertung der Titrierung anhand der cpE und Berechnung der 50 % kulturinfektiösen Dosis nach SPAERMAN und KAERBER (1931) in $KID_{50}$.

3.1.3 Versuchsanordnung

3.1.3.1 Verarbeitung der Versuchsproben

Vor Versuchen mit zellfreiem Virus wurden die Stammsuspensionen (vergl. 3.1.2.2) aufgetaut und durch Verdünnen mit einem Medium aus MEM mit 2 % FRS auf einen Virusgehalt

von $10^6$ bis $10^{6,5}$ $KID_{50}$ pro ml eingestellt. Diese Virussuspension in eiweißarmem Milieu bildete einheitlich in allen Untersuchungen die Testsuspension von zellfreiem Virus.

Die Suspensionen von zellgebundenem Virus wurden unmittelbar vor Versuchsansatz gewonnen und wie beschrieben (vergl. 3.1.2.3) eingesetzt.

In allen Versuchen wurden Versuchsproben wie unbehandelte Viruskontrollen nach Entnahme sofort bis zur Titrierung auf Virusgehalt bei -70°C tiefgefroren. Bei Prüfungen mit chemischem Wirkstoffzusatz wurde damit die viruzide Einwirkung ausgeschaltet. Bei Proben von Zellsuspensionen mit zellgebundenem Virus ging der abschließenden Titrierung eine Ultraschallbehandlung zur restlichen Virusfreisetzung aus Zellen und Zellresten sowie die Abzentrifugierung des Zelldetritus voraus.

Nach Prüfungen an zellgebundenen Viren über die Tenazität gegenüber chemischen Wirkstoffen wurden in der Regel sofort nach der Probeentnahme die behandelten (virushaltigen) Zellen im Eisbad gekühlt, abzentrifugiert, in frischem MEM resuspendiert und erst dann tiefgefroren. Die evt. toxische Wirkung der chemischen Wirkstoffe auf die Kulturzellen des Nachweissystems konnte durch diesen Schritt stark reduziert bzw. eliminiert werden.

3.1.3.2 Inaktivierung mit physikalisch-chemischen Mitteln

Stabilität bei 56°C: Die Virus-Testsuspensionen wurden in gleiche Kahnröhrchen (Glas, 6 mm Innendurchmesser) in Mengen von 2 ml abgefüllt, auf 37°C vorgewärmt und dann in ein Wasserbad von 56°C ($\pm$ 0,5°C) gestellt. In regelmäßigen kurzen Zeitabständen wurden die Röhrchen durchgeschüttelt, Proberöhrchen zu den geplanten Zeiten entnommen und sofort im Eisbad gekühlt.

Stabilität bei pH 3,0: An der Testvirussuspension von 10 ml wurde durch Zugabe von 0,1 n Salzsäure bei Raumtemperatur ein pH von 3,0 unter Kontrolle eines Digital-pH-Meters (Beckman Modell 3500) eingestellt. Aus der Suspension regelmäßig entnommene Proben wurden sofort mit 0,1 n Natronlauge auf pH 7 zurücktitriert.

Einfluß von UV-Licht: Die Bestrahlungsversuche wurden mit einem UV-Strahler 30/89 der Firma Original Hanau vorgenommen (Hg-Niederdruckstrahler mit max. Emission von 254 nm Wellenlänge). Probesuspensionen von 10 ml wurden in offenen Petrischälchen (5 cm Durchmesser) auf einem Magnetrührer im Abstand von 30 cm bestrahlt und in regelmäßigen Zeitabständen Stichproben von 0,1 bis 0,2 ml aus dem Petrischälchen entnommen.

3.1.3.3 Inaktivierung mit viruziden Wirkstoffen

Folgende 6 Wirkstoffe wurden in die Versuche einbezogen:

Formalin - 35 %ige Formaldehydlösung nach DAB 7;
Merck-Artikelnr. 4001

Chlorbleichlauge (Natriumhypochlorit) - enthält 100 bis 150 g aktives Chlor/Liter; Hoechst AG, Frankfurt

Natronlauge, konzentriert - 32 g NaOH/100 ml;
Merck-Artikelnr. 6472

Peressigsäure (P 15) - enthält 15 Gew. % reinen Wirkstoff;
Peroxid-Chemie GmbH, München

Jodtinktur (alkoholische Jodlösung) nach DAB 7 - enthält 2,4 bis 2,7 % Jod; Merck-Artikelnr. 4761

N-Cetylpyridiniumchlorid (Monohydrat);
Merck-Artikelnr. 2340.

Alle Verdünnungen der Mittel wurden jeweils mit destilliertem Wasser hergestellt. Jeweils 1 Teil des Zehnfachen der gewünschten Endkonzentration wurde 9 Teilen der Testvirussuspension zugemischt (1:10), den Viruskontrollen nur PBS. Die Reaktionsgemische wurden bei Raumtemperatur gehalten, in gewünschten Zeitabständen Proben entnommen und diese zwecks Beendigung der viruziden Wirkung dann sofort mit PBS zehnfach verdünnt, nur die Proben mit Natronlauge mit 0,1 n Salzsäure neutralisiert.

## 3.2 Versuche und Ergebnisse

### 3.2.1 Inaktivierung zellfreier und zellgebundener Pockenviren durch physikalisch-chemische Verfahren

THERMORESISTENZ BEI 56°C

Als wesentliches Merkmal für die Virusdifferenzierung generell gilt die Resistenz bei einer Temperatur von 56°C. Mit diesem Kriterium wurde zunächst geprüft, ob bei einer Suspension in zellfreiem Zustand zwischen dem Vacciniavirus und 4 weiteren Orthopockenviren (AP, KP, EP, MP) sowie dem vergleichsweise heterologen Parapockenvirus (StP) Unterschiede auftreten. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 1 dargestellt.

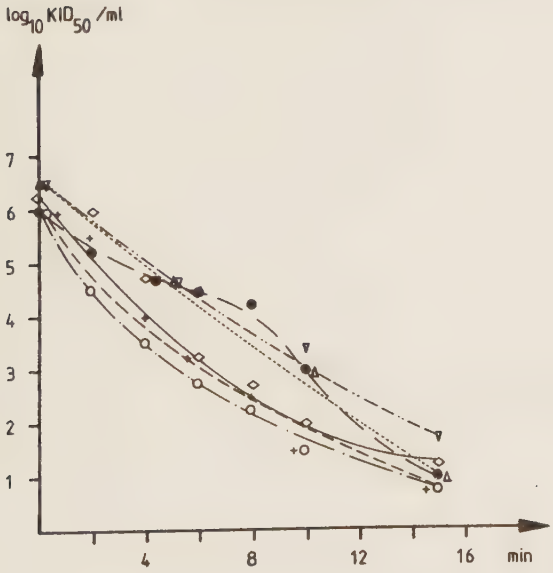
Die Thermoinaktivierung der fünf menschenpathogenen Pokkenviren wie auch des MP-Virus verlief unter den gegebenen identischen Versuchsbedingungen sehr einheitlich. Bei 56°C fiel der Virusgehalt aller Suspensionen innerhalb von 15 Minuten von $10^6$ auf etwa $10^1$ $KID_{50}$/ml ab. Nur in der Anfangsphase der Reaktion trat beim StP-Virus gegenüber den fünf anderen Arten eine Verzögerung auf. Signifikante Stabilitätsunterschiede aber ergaben sich in keiner Weise.

Bei zellgebundenem Virus wurde nur an zwei wichtigen Virusarten (Vacc und AP) diese Thermoresistenz verglichen (Abbildung 2). Sie verhielten sich ebenfalls fast iden-

tisch. Das zellgebundene Virus ließ sich jedoch unvergleichbar schwieriger mit Wärme von 56°C inaktivieren. Eine Reduktion des Virusgehalts von Zellsuspension mit zellständigem Virus um 4 Zehnerpotenzen wurde erst nach 90 Minuten erreicht.

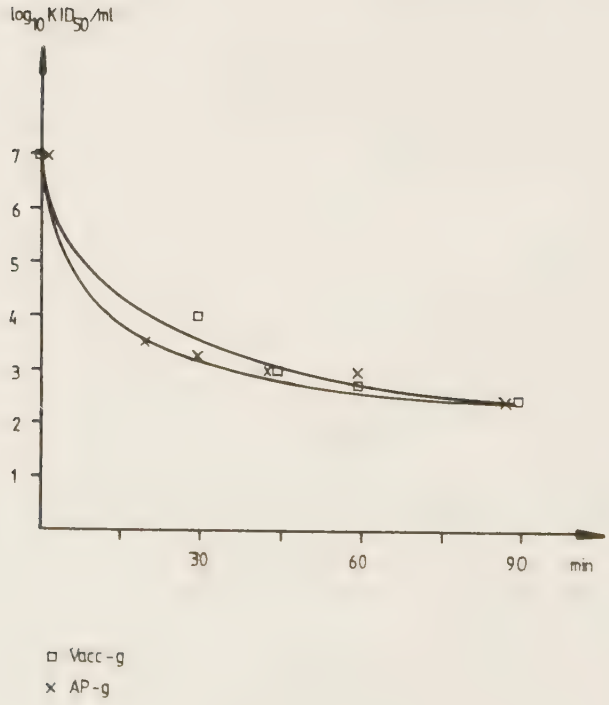
Der eklatante Resistenzunterschied der 2 Orthopockenviren bei freiem und zellgebundenem Zustand wird in der Abbildung 3 mit der Gegenüberstellung der Ergebnisse deutlich. Die zellgebundenen Viren weisen zudem eine ausgesprochen asymptotische Inaktivierungskurve auf.

# Abb.1 Thermoinaktivierung 56°C

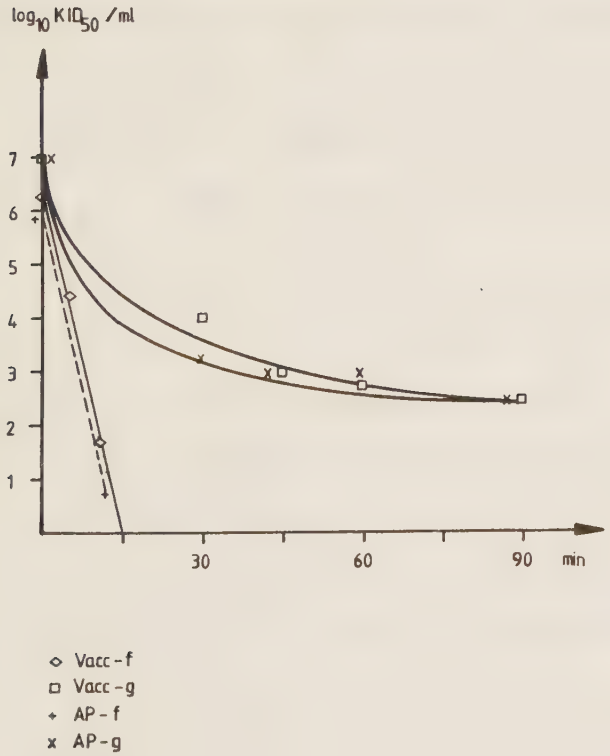



◇ Vacc-f
+ AP-f
● StP-f
○ KP-f
▼ EP-f
▲ MP-f

# Abb.2 Thermoinaktivierung 56°C



# Abb.3 Thermoinaktivierung 56°C



UV-EMPFINDLICHKEIT

Beim Vergleich der UV-Empfindlichkeit freier Viren kamen nur vier Virusarten aus dem vorangegangenen Abschnitt in die Versuche.

Die Virusstammsuspensionen wurden in diesen Versuchen nicht mit dem üblichen Virusmedium, sondern mit reiner PBS verdünnt und auf einen Virusgehalt von $10^{6,0}$ bis $10^{6,75}$ eingestellt. Durch das Fehlen des Phenolrot-Indikators wird eine höhere unkontrollierbare Adsorption von UV-Strahlen durch das Suspensionsmedium umgangen.

Die Transmissionswerte der Virussuspensionen wurden mit einem UV-Meßgerät (Spectroline DM 254 N) kontrolliert und betrugen durchschnittlich 80 - 90 %.

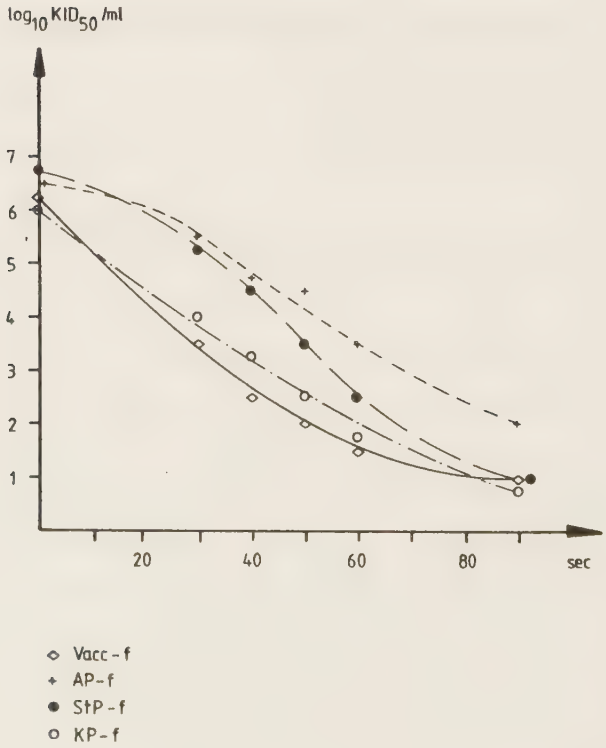
Die Ergebnisse (Abbildung 4) bestätigten die zu erwartende starke Labilität der Pockenviren gegenüber UV-Licht. Zwischen den vier geprüften Spezies ließen sich allerdings keine größeren Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit feststellen. Die gerade signifikanten Differenzen im Inaktivierungsablauf dürfen als Folgen der sensiblen Methodik und den leicht abweichenden Titern der Ausgangssuspensionen interpretiert werden. Die zur weitgehenden Inaktivierung der frei suspendierten Viren notwendigen Bestrahlungszeiten betrugen mehr als 90 Sekunden. Auch in der Kinetik ihrer Inaktivierung verhielten sich

die 4 Virusarten einheitlich. Sie entspricht durchaus als fast lineare Funktion noch einer Reaktion 1. Ordnung.

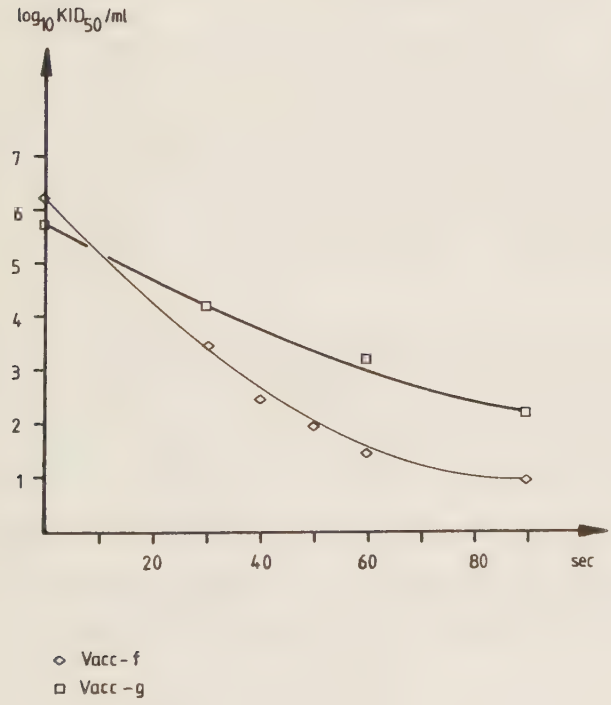
Die Ergebnisse aus der UV-Bestrahlung von Vacciniavirus gebunden in suspendierten Zellen sind in der Abbildung 5 wiedergegeben und dem Verlauf bei freiem Virus gegenübergestellt.

Wie schon im vorherigen Versuch zeigte sich eine größere Widerstandsfähigkeit des zellgebundenen Vacciniavirus gegenüber freiem Virus.

# Abb.4 UV-Strahlen



# Abb.5 UV-Strahlen



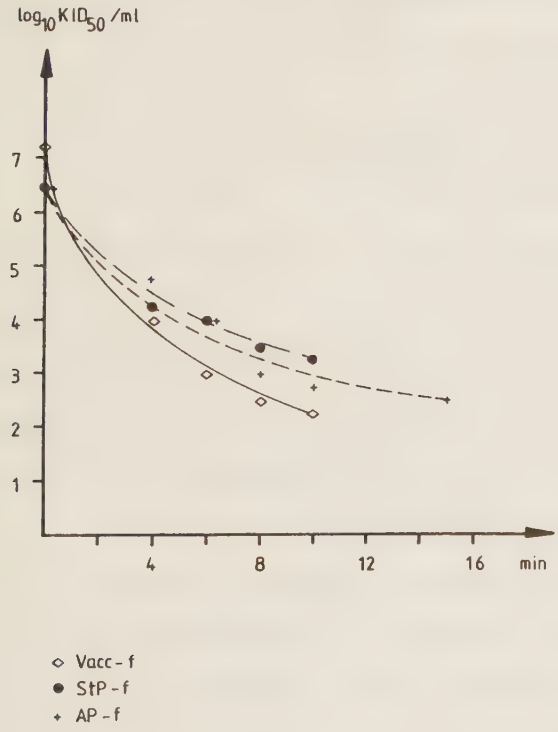
STABILITÄT BEI PH 3

Obwohl sehr viele Untersuchungen über die pH-Stabilität von Viren im sauren Bereich bei pH 2 vorliegen, wurde in den Versuchen die Stabilität bei pH 3 geprüft. Dieser Grenzwert wird allgemein als Maßstab für die Beurteilung einer Virusart als säurestabil bzw. -labil herangezogen.

Suspensionen freier Viren, diesmal nur von Vacc, AP und StP mit einem Virusgehalt von $10^{6,5}$ bis $10^{7,25}$ $KID_{50}$/ml wurden mit n/10 Salzsäure auf pH 3 eingestellt und in Minutenabständen auf den Gehalt an vermehrungsfähigem Restvirus untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche enthält die Abbildung 6.

Eine Reduktion der Infektiosität in den Virussuspensionen um mindestens 3 Zehnerpotenzen, die bei säurelabilen Virusarten gegeben sein soll, trat bei allen 3 Virusarten schon nach einer relativ kurzen sauren Phase von höchstens 15 Minuten ein. Unterschiede zwischen den einbezogenen Pockenviren sind kaum zu erkennen, allenfalls verhielt sich das Vacciniavirus geringfügig labiler.

# Abb.6 pH-Wert 3,0



### 3.2.2 Inaktivierung zellfreier und zellgebundener Pockenviren durch chemische Wirkstoffe

Die Untersuchungen wurden mit 6 Chemikalien aus 5 unterschiedlichen Wirkstoffgruppen durchgeführt, welche vor allem in der Veterinärmedizin bei der Desinfektion, aber auch für Inaktivierungsprozesse grundlegende Bedeutung besitzen. Vergleiche erfolgten wiederum zwischen zellfreien Viren unterschiedlicher Orthopockenarten einerseits und zwischen ausgewählten Spezies in zellfreiem und zellgebundenem Zustand auf der anderen Seite.

Die Einwirkungszeiten für die 6 verschiedenen Desinfizienzien - sie lagen mehrheitlich zwischen 15 und 45 Minuten - wie auch ihre Anwendungskonzentrationen wurden so gewählt oder in Vorversuchen abgeklärt, daß ein nicht zu rascher aber wirksamer Verlauf der Inaktivierung verfolgt und Unterschiede in der Wirksamkeit auf diese Weise erkennbar werden konnten.

Um möglichst einheitliche Bedingungen einzuhalten wurden die chemischen Wirkstoffe mit Aqua dest. vorverdünnt und die Reaktionsgemische immer bei Raumtemperatur (20 - 22°C) inkubiert. Die pH-Werte in den Reaktionsgemischen aus Virussuspension und Wirkstoff lagen nie außerhalb des Bereichs von pH 6 und pH 8. Alle Pockenviren verhalten sich in diesem pH-Milieu absolut stabil.

PERESSIGSÄURE

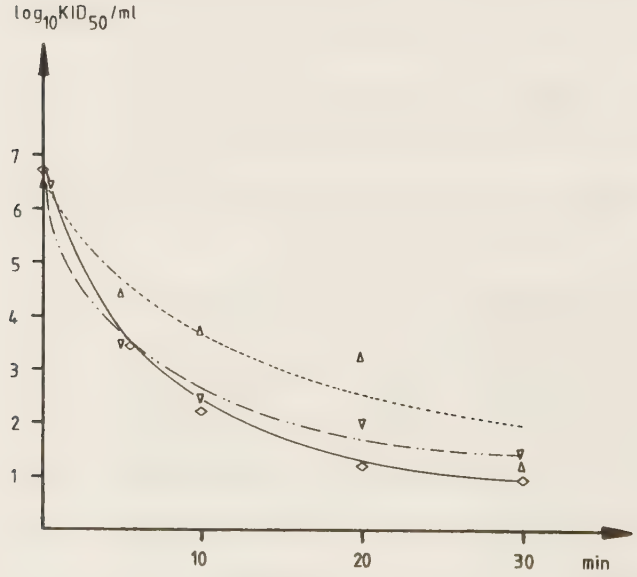
Peressigsäure mit 15 Gew % reinem Wirkstoff

In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß die gegenüber behüllten Viren sehr stark und vor allem sehr rasch viruzid wirksame Peressigsäure am besten in der Konzentration von o,1 % (entspricht 15o ppm reinem Wirkstoff) zu verwenden ist, wenn eine etwas langsamere für Vergleiche besser geeignete Wirkung erzielt werden soll.

Die Wirkung wurde nur im Suspensionsversuch an freien Viren untersucht und diesmal neben dem Vacc-Virus EP- und MP-Virus vergleichend einbezogen. Das Ergebnis ist in der Abbildung 7 dargestellt.

Signifikante Unterschiede in der Peressigsäure-Empfindlichkeit der 3 Virusarten ergaben sich einmal mehr nicht. Die Inaktivierungskurven verlaufen asymptotisch. Nach 3o Minuten war der Virusgehalt aller Suspensionen etwa um 5 Zehnerpotenzen reduziert, was einer Inaktivierung von 99,999 % des Ausgangsgehalts an infektiösen Einheiten entspricht.

# Abb.7 Peressigsäure 0,1%




◇ Vacc-f
△ MP-f
▽ EP-f

NATRONLAUGE

Konzentrierte Natronlauge mit 32g NaOH/1oo ml Aqua dest.

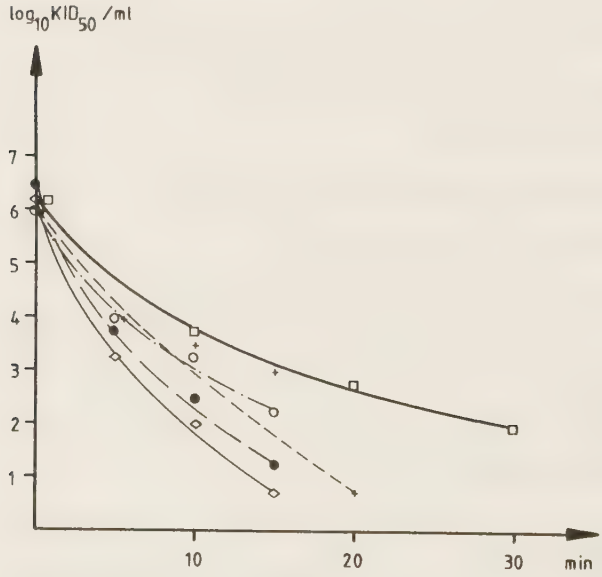
Die Natronlauge, bei der Desinfektion gewöhnlich in 1 oder 2 %iger Konzentration verwendet, wurde in ihrer vergleichenden Wirkung auf Pockenviren in der Endkonzentration von nur o,1 %ig eingesetzt, um die sehr rasche Wirkung auf behülltes Virus zu verzögern.

Geprüft wurde gegen die gleichen Pockenviren wie im vorausgehenden Abschnitt. Alle Ergebnisse sind in der Abbildung 8 dargestellt.

Die zellfrei vorliegenden Pockenviren ließen sich annähernd gleich gut erfassen. AP- und KP-Viren scheinen gegenüber diesem Wirkstoff geringfügig weniger labil zu sein als Vacc- und StP-Viren. Die Differenzen jedoch bewegen sich an der Grenze der Signifikanz, die unter den vorliegenden Versuchs- und Nachweisbedingungen etwa eine Zehnerpotenz beträgt.

Zellgebundenes Vacc-Virus verhielt sich im Vergleich deutlich stabiler und benötigte für eine vergleichbare Reduktion des Virus-Ausgangsgehalts eine doppelt lange Einwirkungszeit. Insgesamt gesehen war aber die Wirksamkeit der Natronlauge auch auf Virus in suspendierten Kulturzellen relativ gut.

# Abb.8 Natronlauge 0,1%




◇ Vacc - f
□ Vacc - g
+ AP - f
● StP - f
○ KP - f

FORMALIN

35 %ige Formaldehydlösung nach DAB 7 (1968).

Der Formaldehyd bzw. Formalin kann als der wichtigste und am meisten verwendete Wirkstoff für die Inaktivierung und Desinfektion von Viren bezeichnet werden.

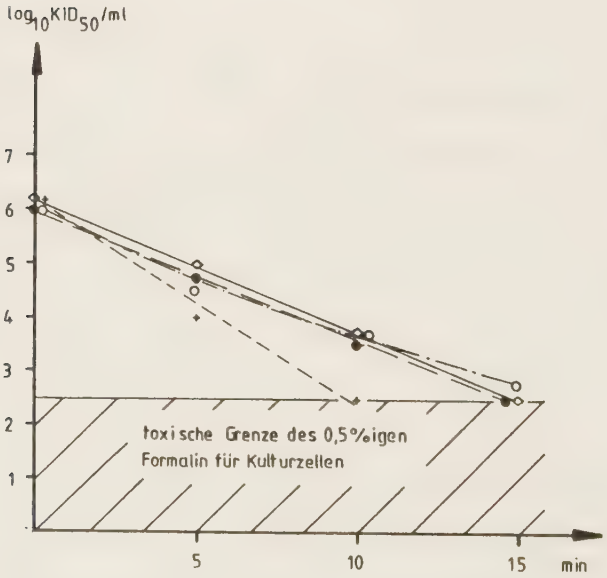
Im Versuch wurde die einheitliche Endkonzentration von 0,5 % Formalin gewählt. Vorprüfungen in Suspensionsversuchen hatten ergeben, daß das Formalin in dieser Konzentration nach Ablauf einer adaequaten Zeit den Virusgehalt des Testvirus um mehrere Zehnerpotenzen reduziert.

Vergleichend untersucht wurde zunächst der Ablauf der Formalininaktivierung bei Vacc-, AP-, KP- und StP-Viren in zellfreier Suspension. Die untere Grenze für den Virusnachweis betrug unter den gegebenen Bedingungen $10^{2,5}$ $KID_{50}$/ml. Schwächere Verdünnungen der Reaktionsgemische wirkten nach der Verimpfung auf das Virus-Nachweissystem, die Zellkulturen, noch toxisch, sodaß ein Nachweis kleinerer Restvirusmengen nicht mehr möglich war.

Die Inaktivierung der 4 Virusarten erfolgte praktisch gleichlaufend und zeigte keinerlei Artdifferenzen in der Formalinempfindlichkeit auf. Sie verlief zuerst fast linear, dann - soweit noch an der Toxizitätsgrenze erfaßbar - asymptotisch. Nach 10 bis 15 Minuten waren etwa

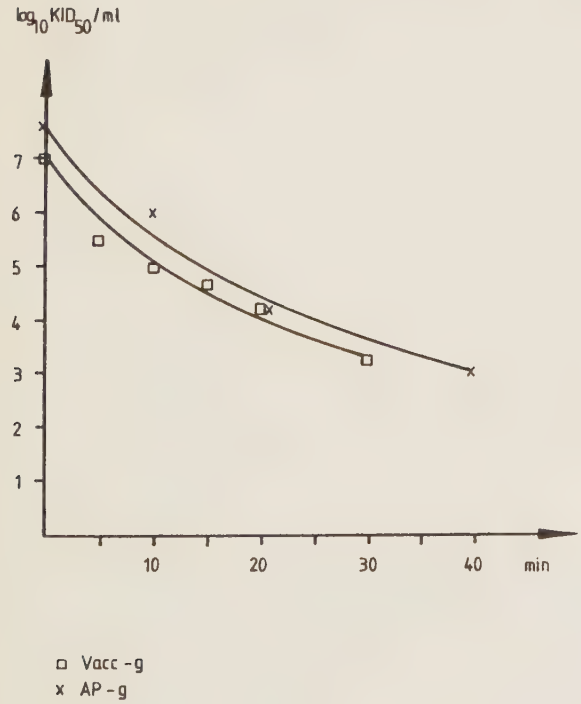
99,95 % der suspendierten Viren inaktiviert (Abbildung 9). Zellgebundene Vacc- und AP-Viren, in ihrer Formalinempfindlichkeit auch in diesem Versuch nicht differierend, verhielten sich eindeutig widerstandsfähiger. Die Inaktivierung lief fast linear ab (Abbildung 10), jedoch signifikant langsamer als bei zellfreiem Virus (Abbildung 11). Es wurde etwa die doppelte Einwirkungsdauer für den quantitativ gleichen Effekt benötigt.

Abb.9 Formalin 0,5%

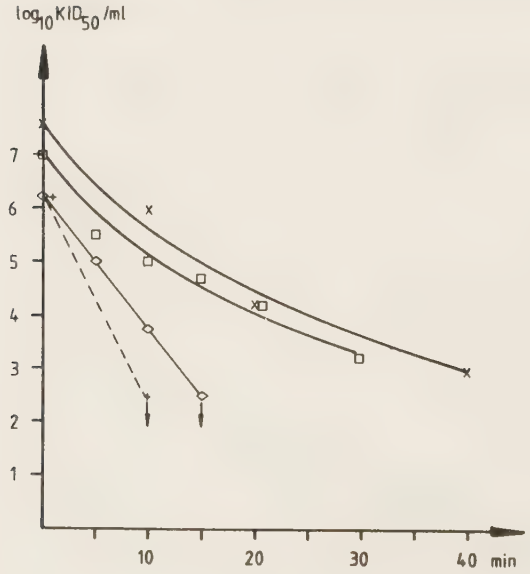



◇ Vacc-f
+ AP-f
● StP-f
○ KP-f

# Abb.10 Formalin 0,5%



# Abb.11 Formalin 0,5%




◇ Vacc - f
□ Vacc - g
• AP - f
× AP - g

N-CETYLPYRIDINIUMCHLORID

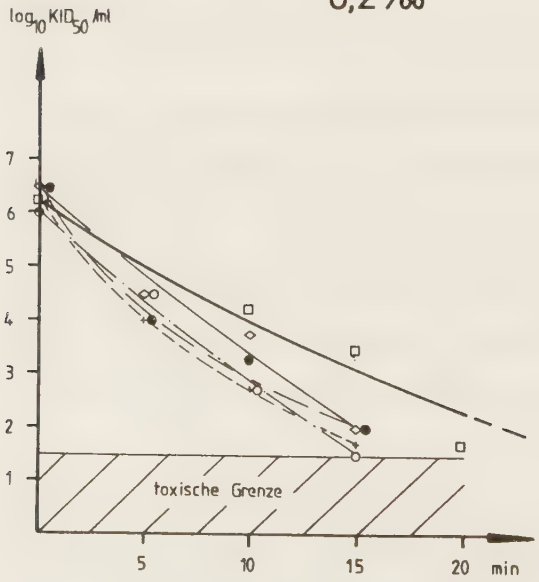
Untersuchungen mit dieser kationenaktiven Verbindung und Pockenviren lagen nicht vor. Andere Präparate ähnlicher Art sind öfter auf ihre Viruzidie gegen Viren verschiedener Art geprüft worden. Die Ergebnisse aber fielen sehr widersprüchlich aus.

In eigenen Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß eine viruzide Wirkung mit N-Cetylpyridiniumchlorid schon bei einer Konzentration von 0,2 g/Liter gegeben ist.

Nach der Vorverdünnung auf einen einheitlichen Ausgangsvirusgehalt unterschieden sich im Suspensionsversuch mit freiem Virus Vacc-, AP-, KP- und StP-Viren in keiner Phase hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber N-Cetylpyridiniumchlorid. Ein fast einheitlicher Abfall des Virusgehalts um 4 Zehnerpotenzen bis an die toxisch bedingte Nachweisgrenze erfolgte jeweils innerhalb 15 Minuten (Abbildung 12).

In zellgebundener Form, in der nur das Vacc-Virus vergleichend untersucht wurde, war die Empfindlichkeit dieses Virus nur wenig geringer. Eine etwas verlängerte Einwirkungszeit wirkte bei gleichartig verlaufender fast linearer Inaktivierung zuverlässig viruzid.

Abb.12 N-Cetylpyridiniumchlorid 0,2‰




◇ Vacc - f
□ Vacc - g
+ AP - f
● StP - f
○ KP - f

CHLORBLEICHLAUGE

Natriumhypochlorit mit einem Anteil von 100 bis 150 g aktivem Chlor pro Liter.

Für die rasch und per Oxidation viruzid wirkende Chlorbleichlauge, als Vertreter der Wirkstoffgruppe der Halogene herangezogen, hatte sich in Vorversuchen die Konzentration von 0,2°/$_{oo}$ (entspricht 0,2 g Chlor/Liter) als am besten geeignet für eine vergleichende Erfassung ihrer Wirkung auf Pockenviren erwiesen. In der Chlorbleichlauge wirkt überwiegend ihr Anteil an freiem aktivem Chlor in wässriger Lösung stark viruzid.

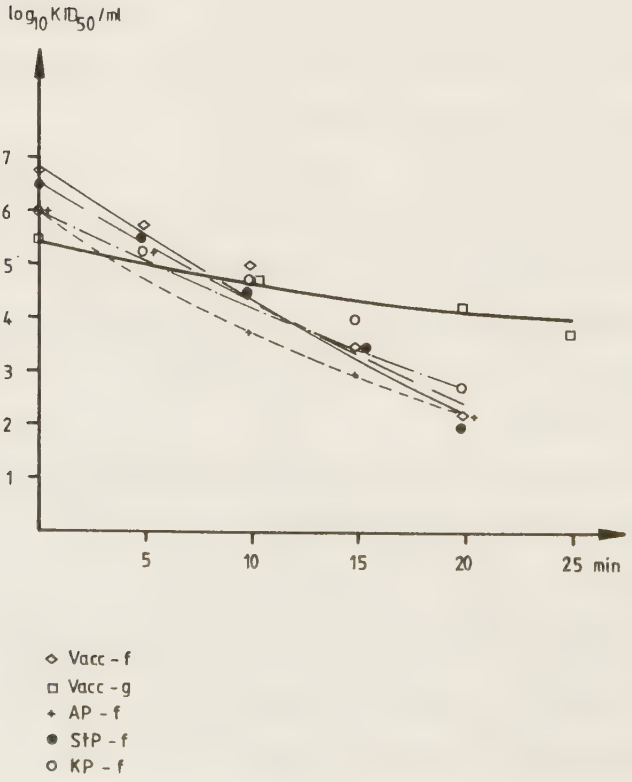
Die Inaktivierung der 3 repräsentativen Orthopockenviren und des Parapockenvirus in zellfreier Suspension verlief wiederum fast parallel und annähernd nach einer Reaktion 1. Ordnung. Unterschiede zwischen diesen 4 Pockenvirusarten traten somit unter identischen Reaktionsbedingungen nicht auf.

In der Abbildung 13, in welcher alle Ergebnisse zusammengestellt werden, ist auch der Inaktivierungsverlauf bei suspendiertem, aber an Zellen gebundenem Vacc-Virus zum Vergleich eingezeichnet. In diesem Zustand wurde das Virus durch das freie Chlor aus der Chlorbleichlauge markant schwächer angegriffen. Obwohl mit einem weit geringerem Ausgangs-Virusgehalt beginnend ließ sich - im Ver-

gleich zu freiem Virus - in gleicher Zeit nur ein Bruchteil des zellgebundenen Virus inaktivieren.

Die Grenze der Chlortoxizität für die Kulturzellen wurde in diesen Untersuchungen nicht tangiert.

Abb.13 Chlorbleichlauge 0,2‰

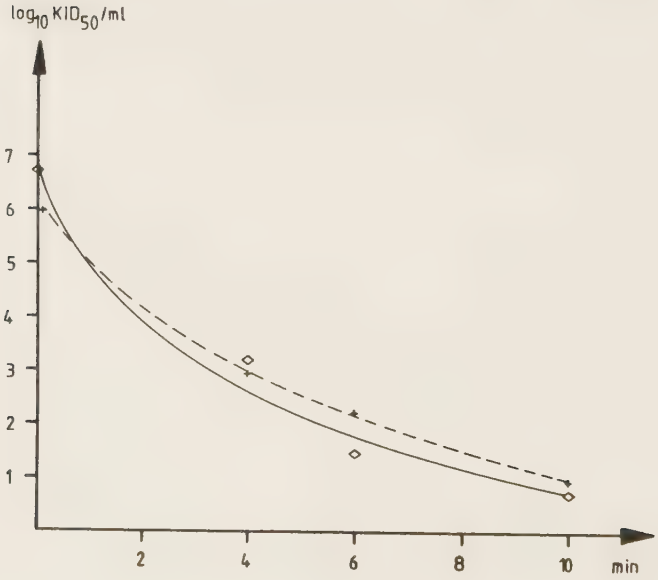


JODTINKTUR

Alkoholische Jodlösung nach DAB 7 mit 2,4 bis 2,7 % Jod.

Als zweiter Wirkstoff der gut viruziden Halogene wurde 1 %ige Jodtinktur (enthält 270 mg Jod/Liter) für die vergleichende Prüfung an zwei ausgewählten Orthopockenviren (Vacc und AP) herangezogen. Die beiden menschenpathogenen Vertreter der Pockenviren waren gegenüber der Jodtinktur sehr empfindlich. Ein Verlust an Infektiosität um mehr als 5 Zehnerpotenzen erfolgte bei Zimmertemperatur nach 10 Minuten Einwirkungsdauer (Abbildung 14).

# Abb.14 Jodtinktur 1,0%



## 4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Menschenpathogene Pockenviren der Genera Orthopoxvirus und Parapoxvirus wurden im vorgezogenen Teil der Aufgabenstellung als zellfrei suspendierte Viren im Vergleich und unter identischen Bedingungen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber einigen wesentlichen physikalischen und chemischen Einflüssen untersucht. Bisher vorliegende und verwertete Daten basierten fast ausschließlich aus Prüfungen am Vacciniavirus, dem Impfvirus gegen die Menschenpocken, als Modellvirus. Der Vergleich dieses Virus mit anderen Pockenviren ließ kaum wesentliche Differenzen und neue Erkenntnisse erwarten. Doch galt es vor weiteren Modellversuchen und Folgerungen zu klären, ob sich zwar nahe verwandte aber doch artverschiedene, gegenüber dem Vacciniavirus vergleichsweise "wilde", natürlich vorkommende Pockenviren abweichend verhalten.

Aufgrund der Ergebnisse der hier vorgelegten Untersuchungen kann dies verneint werden. Im Prinzip wurden zwischen den in der Regel 4, z.T. auch weniger verschiedenen untersuchten Virusarten im Suspensionsversuch mit zellfreiem Virus keine signifikanten Unterschiede, weder im Verhalten gegenüber physikalischen noch gegenüber chemischen inaktivierenden Einflüssen festgestellt.

Es bestätigte sich die bekannte Thermolabilität bei 56°C. Die Inaktivierung verlief, wie schon KAPLAN (1958) darlegte, nicht nach einer Reaktion 1. Ordnung, sondern asymptotisch. Bei den hier verwendeten Suspensionen mit Kulturvirus sank der wesentliche Virusgehalt allerdings etwas rascher ab, als beispielsweise in den Versuchen von FENNER (1958), GALASSO and SHARP (1963) oder WOODROOFE (1960). Auch bestätigte sich die vom Vacciniavirus bekannte starke UV-Empfindlichkeit bei den anderen untersuchten Pockenviren wie auch die Labilität bei pH 3. Die eigenen Ergebnisse weichen von denen aus jüngeren Untersuchungen nicht wesentlich ab (BRODOROTTI und MAHNEL, 1982). Die Inaktivierung verlief bei allen Spezies beinahe linear.

Gegenüber 6 bekannt viruziden Wirkstoffen, die bei den vergleichenden Empfindlichkeitsprüfungen herangezogen wurden, waren die zellfrei eingesetzten Pockenvirusarten alle sehr empfindlich und ließen sich z.T. schon mit sehr geringen Wirkstoffkonzentrationen inaktivieren. Die rasche Inaktivierung durch Formalin 0,5 %ig von suspendiertem Vacciniavirus hatte schon 1930 GILDEMEISTER ermittelt, 1966 wurden die jetzt auch bei anderen Pockenvertretern erhaltenen Werte von BINGEL und HERMANN bestätigt. Die Peressigsäure wirkte bei SPRÖSSIG und MÜCKE (1968) in 0,2 %iger Konzentration innerhalb von 2 Minuten zuverläs-

sig und alle Vacciniaviren erfassend, in den eigenen Versuchen sogar bereits 0,1 %ig in wenigen Minuten sehr gut. Die quaternäre Ammoniumverbindung N-Cetylpyridiniumchlorid inaktivierte schon in der Konzentration von 0,2‰ beträchtlich und vergleichsweise rasch. Von den Halogenen bestätigten in den eigenen Untersuchungen freies Chlor und Jod die gute Wirkung gegen alle Pockenviren, wie es bereits beschrieben wurde (OTTIS, 1976; MAHNEL, 1977).

Die Ergebnisse der vorliegenden vergleichenden Prüfungen mit zellfrei suspendierten Pockenviren erlauben es festzustellen, daß grundlegende Unterschiede in der Widerstandsfähigkeit zwischen der Mehrzahl der Pockenviren, mit hoher Sicherheit zumindest zwischen den menschenpathogenen tierischen Pockenviren nicht zu erwarten sind. Für Tenazitätsprüfungen erscheint es deshalb ausreichend, Versuche nur an ein oder zwei Pockenviren als Modelle vorzunehmen. Die Resultate lassen zuverlässige Rückschlüsse auch auf andere Pockenvirusspezies mit vergleichbarem Aufbau weitgehend zu.

Die zweite Fragestellung bezog sich auf die Widerstandsfähigkeit von Pockenviren, wenn sie im zellgebundenen Zustand vorliegen, wie es natürlichen Verhältnissen und der Vermehrungseigenart dieser Virusfamilie angemessen ist. Die Untersuchungen wurden nicht an virusinfizierten Geweben, Organstückchen oder gar partiell trockenen

Krusten oder Borken vorgenommen. Ergebnisse aus solchen Prüfungen lagen bereits einige vor (GILDEMEISTER et al., 1930; GROSSGEBAUER et al., 1975; SCHÜMANN und GROSSGEBAUER, 1977). Sie boten jedoch wenig Vergleichsmöglichkeiten. Abgesehen von der Härte solcher Prüfbedingungen wäre auch eine einheitliche, für Vergleiche notwendige Methodik nicht gegeben. Verwendet wurden zarte Kulturzellen, die noch intakt waren und intrazellulär Pockenviren enthielten. Für die Vergleiche mit den Ergebnissen an zellfreien Viren erschien auch, unter Verwertung der Erkenntnisse aus den vorangegangenen Versuchen, die Einbeziehung von nur ein oder zwei Vertretern der Orthopockenviren ausreichend.

Trotz der nur relativ wenig erschwerten Wirkungsbedingungen, wie sie bei einzeln suspendierten virushaltigen Zellen gegenüber zellfreiem Virus in wässriger Suspension gegeben sind, erwiesen sich die zellgebundenen Pokkenviren wesentlich widerstandsfähiger. Hervorstechend war schon die erhöhte Thermoresistenz bei 56°C. Eine stattliche Menge an Restvirus blieb nach 90 Minuten Wärmeeinwirkung noch unvermindert infektiös. Gegenüber freiem Virus bedeutet dies eine Resistenzsteigerung um ein Vielfaches. Das Ergebnis macht verständlich, daß eine vollständige Inaktivierung von Vacciniavirus in Hautepithelien innerhalb 1 Stunde nur bei 90°C Hitze gelang (SCHÜ-

MANN und GROSSGEBAUER, 1977). Auch die außergewöhnliche UV-Empfindlichkeit der Orthopockenviren war bei zellgebundenem Status um ein Mehrfaches geringer als bei freiem Virus. Die viruziden Chemikalien, alle bewährte Wirkstoffe der Desinfektion, vermochten in den vergleichenden Testen die zellgebundenen Orthopockenviren weit weniger intensiv anzugreifen als die zellfreien. Am wenigsten herabgesetzt war die Wirkung der Natronlauge und der quaternären Ammoniumverbindung. Sehr deutlich stabilisiert erwiesen sich die zellgebundenen Viren jedoch gegenüber Formalin und freiem Chlor. Ähnliche Versuche durchgeführt und auf die erhöhte Stabilität von Viren hingewiesen, die unter natürlichen Bedingungen überwiegend zellgebunden bleiben, haben in neuerer Zeit ROHDE et al. (1977) und SPROCKHOFF et al. (1982). Sie bezogen das Vacciniavirus bei Prüfungen eines Händedesinfektionsmittels ein.

Die eigenen Ergebnisse unterstreichen, daß sich Pockenviren gegenüber schädigenden physikalischen und chemischen Noxen zwar prinzipiell sehr einheitlich verhalten, ihre Widerstandsfähigkeit jedoch unter epidemiologischen Kriterien wesentlich höher einzuschätzen ist, als meist aufgrund von Labortesten im Suspensionsversuch an freiem Virus angenommen wird. In vivo bleiben 90 % der Pockenviren nach ihrer zellulären Vermehrung und dem Zelltod

zellgebunden (ROLLE und MAYR, 1978). Dieser Tatsache sollte bei der antiviralen Dekontamination und Desinfektion mehr Rechnung getragen werden, als es bisher der Fall war.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Widerstandsfähigkeit von insgesamt 6 Pockenviren gegenüber einigen wesentlichen physikalischen und chemischen Einflüssen wurde einmal im Vergleich zwischen den Arten anhand des Suspensionsversuchs mit freiem Virus und zum anderen im Vergleich zwischen freiem und zellgebundenem Virus untersucht.

Zwischen den einzelnen Pockenvirusarten ließen sich keine signifikanten Differenzen hinsichtlich Tenazität bzw. Empfindlichkeit gegenüber Wärme (56°C), UV-Strahlen, pH 3, Formalin, Natronlauge, Peressigsäure, einer quaternären Ammoniumverbindung, freiem Chlor und Jod erfassen. Deutlich, z.T. sogar um ein Vielfaches resistenter als in zellfreier Suspension erwies sich Virus im zellgebundenen Zustand. Auf die praktische Bedeutung dieser erhöhten Widerstandsfähigkeit bei Pockenviren, die unter natürlichen Verhältnissen überwiegend an Zellen gebunden vorkommen, wird hingewiesen.

Summary

Comparative Investigations on the Tenacity of Cell-free and Cell-associated Orthopoxviruses

The tenacity of six different poxviruses against some important physical and chemical effects was investigated. The survival of the different viruses in the suspension test employing cell-free virus was compared with cell-free and cell-associated virus.

There were no significant differences between individual poxvirus species with respect to tenacity resp. sensitivity to heat (56°C), UV irradiation, pH 3, formalin, sodium hydroxide, peracetic acid, a quaternary ammonium compound, free chlorine and iodine.

Cell-associated virus was much more - in some cases even many times more - resistant as in cell-free suspension. The practical aspects of this increased tenacity of poxviruses, which occur mainly cell-associated under natural conditions, is discussed.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Abel, P.
Multiplicity reactivation and marker rescue with vaccinia virus.
Virology 17, 511 (1962)

Albrecht, J.
Vergleichende Desinfektionsmittelprüfungen an verschiedenen Virusarten.
Arch. Hyg. 141, 460 (1957)

Angeloff, St., P. Panajotoff, N. Manolowa, P. Nikoloff
Wirkung einiger chemischer Mittel auf das Vakzinevirus und auf das Virus der Schafpocken.
Arch. exper. Vet. Med. 10, 365 (1956)

Apostolov, K.
The effect of iodine on the biological activities of myxoviruses.
J. Hyg. Camb. 84, 381 (1980)

Beukers, R., W. Berends
The effects of UV-irradiation on nucleic acids and their components.
Biochim. Biophys. Acta 49, 181 (1961)

Bingel, K.F., Ch. Hermann
Die experimentelle Desinfektion des Vakzinevirus als Grundlage für die klinische Pockendesinfektion.
Die medizinische Welt 17, 76 (1966)

Bögel, K., A. Mayr
Ein Resistenztest mit Detergentien zur Charakterisierung von Viren.
Zbl. Bakt. I. Orig. 186, 134 (1962)

Boling, M.E., M.L. Randolph
Effects of x-irradiation on a temperate bacteriophage of haemophilus influenzae.
J. Virol. 22, 47 (1977)

Briefman-Kline, L., R.N. Hull
The virucidal properties of peracetic acid.
Amer. J. Clin. Path. 33, 30 (1960)

Brodorotti, H. St. v.
Vergleichende Untersuchungen über die Inaktivierung verschiedener Virusarten durch Gammastrahlen.
Vet. Med. Diss. München (1978)

Brodorotti, H. St. v., H. Mahnel
Inaktivierung von Viren und Bakterien in Klärschlamm durch Gammastrahlen.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 170, 71 (1980)

Brodorotti, H. St. v., H. Mahnel
Vergleichende Untersuchungen zur UV-Empfindlichkeit von Viren.
Zbl. Vet. Med. B, 29, 129 (1982)

Dertinger, H., H. Jung
Molekulare Strahlenbiologie.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1969)

Downie, A.W., K.R. Dumbell
Pox viruses.
Ann. Rev. Microbiol. 10, 237 (1956)

Dunham, W.B., W.J. Mac Neal
Inactivation of vaccinia virus by mild antiseptics.
J. Lab. Clin. Med. 28, 947 (1943)

Eggensperger, H.
Desinfektionswirkstoffe und ihre Wirkungsmechanismen.
Dtsch. Apotheker Zeitung 193, 785 (1973)

Epstein, H.T.
Identification of radiosensitive volume with nucleic acid volume.

Nature 171, 394 (1953)

Fenner, F.
The biological characteristics of several strains of vaccinia, cowpox and rabbitpox viruses.

Virology 5, 502 (1958)

Fenner, F.
Portraits of viruses: The pox viruses.

Intervirology 11, 137 (1979)

Freer, P.C., F.G. Novy:
On the formation, decomposition and germicidal action of benzoyl, acetyl and diacetyl peroxides.

Amer. Chem. J. 27, 161 (1902)

Galasso, G.J., D.G. Sharp:
Homologous inhibition with heated and ultraviolet-treated vaccinia-virus in cultures of L cells.

Virology 20, 1 (1963)

Galasso, G.J., D.G. Sharp
Homologous inhibition, toxicity and multiplicity with ultraviolet-irradiated vaccinia virus.

J. Bact. 85, 1309 (1963 a)

Gershenfeld, L.
Iodine as a virucidal agent.

J. Amer. Pharm. Ass. 44, 177 (1955)

Gildemeister, E., E. Hailer, G. Heuer:
Das Verhalten des Vakzinevirus gegenüber keimtötenden Stoffen.

Arch. Hyg. Bakt. 103, 132 (1930)

Ginoza, W.:
Inactivation of viruses by ionizing radiation and by heat.

In: Maramorosch, K., H. Koprowski: Methods in Virology IV, S. 139, Academic Press, New York (1968)

Grossgebauer, K., G. Spicher, J. Peters, E. Kuwert, H.D. Pohle, H. Kerner
Experiments on terminal disinfection by formaldehyde vapor in the case of smallpox.

J. Clin. Microbiol. 2, 516 (1975)

Groupé, V., C.G. Engle, P.E. Gaffney, R.A. Manaker
Virucidal activity of representative antiinfective agents against influenza A and vaccinia viruses.

Appl. Microbiol. 3, 333 (1955)

Harper, J.M.M., M.T. Parsonage, H.R.B. Pelham, G. Darby
Heat inactivation of VE particle-associated functions: Properties of heated particles in vivo and in vitro.

J. Virol. 26, 646 (1978)

Henneberg, G., E. Höppner
Desinfektionsversuche an Viren.

Arch. Hyg. Bakt. 144, 149 (1960)

Herrlich, A., A. Mayr, E. Rodenwaldt
Die Pocken.

2. neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart (1967)

Hiatt, C.W.
Kinetics of the inactivation of viruses.

Bact. Reviews 28, 150 (1964)

Joklik, W.
The intracellular fate of rabbitpox virus rendered noninfectious by various reagents.

Virology 22, 620 (1964)

Kärber, G.
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.

Arch. exp. Path. Pharmak. 162, 480 (1931)

Kaplan, C.
The heat inactivation of vaccinia virus.

J. gen. Microbiol. 18, 58 (1958)

Kewitsch, A., W. Weuffen
Wirkung chemischer Desinfektionsmittel gegenüber Influenza-, Vakzinia- und Poliomyelitisvirus.

Zschr. ges. Hyg. 16, 687 (1970)

Koch, H.A., M. Sprössig, H. Mücke
Über die antimikrobielle Wirkung der Peressigsäure. Untersuchungen zur fungiziden Wirkung.

Die Pharmazie 22, 520 (1966)

Kunz, W.
Untersuchungen über die Eignung einiger Träger zur Prüfung von Desinfektionsmitteln gegenüber Virusarten.

Vet. Med. Diss. München (1974)

Larkin, E.P.
Thermal inactivation of viruses.

US-Army Technical report Natick, TR-78/002 (1977)

Lehmann: Zit. nach Gildemeister-Haagen-Waldmann
Handbuch der Viruskrankheiten.

Gustav Fischer Verlag, Jena (1939)

Liebermann, H.
Bemerkungen zur Wirkung des ultravioletten Lichtes auf Viren.

Arch. exp. Vet. Med. 21, 1015 (1967)

Liess, B.
Virusinaktivierung mit chemischen Mitteln.
18. Internat. Hygiene-Colloquium. Publikation Th. Goldschmidt AG, Essen 28, 36 (1974)

Madin, S.H., P.C. Andriese, N.B. Darby
The in vitro cultivation of tissues of domestic and laboratory animals.
Amer. J. vet. Res. 18, 932 (1957)

Mahnel, H.
Viruzide Wirkung von Desinfektionsmitteln im Suspensionsversuch.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 87, 385 (1974)

Mahnel, H.
Untersuchungen zur Virusinaktivierung in Trink- und Oberflächenwasser.
Zbl. Bakt. Hyg.,I. Abt. Orig. B 165, 527 (1977)

Mahnel, H.
Virusinaktivierung in Wasser durch Anodische Oxydation.
Zbl. Bakt. Hyg.,I. Abt. Orig. B 166, 542 (1978)

Mahnel, H.
Resistenzunterschiede zwischen Viren verschiedener Gruppen gegenüber einigen chemisch-physikalischen Dekontaminationsverfahren.
Infection 7, 240 (1979)

Mahnel, H.
Desinfektion von Viren.
Zbl. Vet. Med. B, 30, 81 (1983)

Mahnel, H., M. Herlyn
Stabilität von Teschen-, ND- und Vacciniavirus gegenüber 5 Desinfektionswirkstoffen.
Zbl. Vet. Med. B, 23, 403 (1976)

Mahnel, H., W. Kunz
Eignung von Keimträgern zur Prüfung von Desinfektionsmitteln gegenüber Virusarten.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 89, 138 und 149 (1976)

Mahnel, H., H. St. v. Brodorotti, K. Ottis
Empfindlichkeit von Viren gegen Gammastrahlen.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, 170, 57 (1980)

Mahnel, H., H. St. v. Brodorotti
Thermoinaktivierung von Viren durch Mikrowellen.
Zbl. Vet. Med. B, 28, 509 (1981)

Mathews, R.E.F.
Classification and nomenclature of viruses.
Intervirology 17, 1 (1982)

Mayr, A.
Viruskrankheiten - Virusdesinfektion. Neue Erkenntnisse der Virusforschung.
Notabene medici 5, 5 (1975)

Mayr, A., K. Kalcher
Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelpocken in der Zellkultur.
Arch. ges. Virusforsch. 10, 72 (1960)

Mayr, A., H. Mahnel, E. Munz
Systematisierung und Differenzierung der Pockenviren.
Zbl. Vet. Med. B, 19, 69 (1972)

Mayr, A., H. Mahnel, L. Grün
Untersuchungen zur Desinfektion viruskontaminierter Zahnprothesen.
Hyg. u. Med. 5, 499 (1980)

Mayr, A., P.A. Bachmann, B. Mayr-Bibrack, G. Wittmann
Sicherheit bei virologischen Arbeiten von Mahnel, H. In:
Virologische Arbeitsmethoden Band IV. Gustav Fischer Verlag, Jena (1982)

Mc Crea, J.F., J. Preiss, J. O'Loughlin
Physical studies on pox viruses. I. Inactivation of vaccinia virus infectivity with low-energy electrons.
Biophys. J. 1, 43 (1960)

Müller, G.
Die Desinfektion von Trinkwasser durch UV-Bestrahlung.
Veröffentlichung der Hanau-Quarzlampen GmbH (1974)

Ottis, K.
Vergleichende Untersuchungen über die Tenazität von Viren in Trink- und Oberflächenwasser.
Vet. Med. Diss. München (1976)

Rauth, A.
The physical state of viral nucleic acid and sensivity of viruses to ultraviolet light.
Biophys. J. 5, 257 (1965)

Rohde, G., M. Setzke, W. Bethe
Zur Wirkung von Lysoformin und Formaldehyd-Seifenlösung gegen intrazelluläres Virus.
Wehrmed. Mschr. 21, 141 (1977)

Rolle, M. und A. Mayr
Mikrobiologie und Seuchenlehre.
4. Auflage, F. Enke Verlag Stuttgart (1978)

Schümann, K.-O., K. Grossgebauer
Versuche zur Desinfektion von Vakziniaviren in Kaninchenborken bzw. an der Hand.
Zbl. Bakt. Hyg.,I. Abt. Orig. B,164, 45 (1977)

Spearman, C.
zitiert nach Kärber, G., Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch. exp. Path. Pharmak. 162, 480 (1931)

Spicher, G.
Desinfektionsmittel und Desinfektionsverfahren unter besonderer Berücksichtigung der Faktoren, die ihre Wirksamkeit und Brauchbarkeit beeinflussen.

Path. Microbiol. 36, 259 (1970)

Spicher, G.
Grundlagen der Desinfektion und der Desinfektionsmittelprüfung. Ein Beitrag zu speziellen Problemen.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, 157, 392 (1973)

Sprockhoff, H. v., M. Setzke, G. Rohde
Zur Prüfung von Desinfektionsmitteln auf Viruzidie.

Wehrmed. Mschr. 26, 214 (1982)

Sprössig, M.
Anwendungsmöglichkeiten der Peressigsäure für die Desinfektion und Sterilisation.

Hyg. u. Med. 4, 294 (1979)

Sprössig, M., H. Mücke
Über die stark viruzide Eigenschaft eines praktisch anwendbaren Alkohol-Peressigsäure-Gemisches.

Wiss. Z. Karl-Marx-Univ. Leipzig, Math. naturwiss. R., Heft 5, 167 (1964)

Sprössig, M., H. Mücke
Steigerung der virusinaktivierenden Wirkung von Peressigsäure durch n-Propylalkohol.

Acta biol. med. germ. 14, 199 (1965)

Sprössig, M., H. Mücke, C.H. Tilgner-Peter
Über die antimikrobielle Wirkung der Peressigsäure. Untersuchungen zur bakteriziden und sporiziden Wirkung.

Die Pharmazie 9, 517 (1967)

Sprössig, M., H. Mücke
Über die antimikrobielle Wirkung der Peressigsäure. 5. Mitteilung: Untersuchungen zur viruziden Wirkung.

Die Pharmazie 23, 665 (1968)

Terzi, M.
Comparative analysis of inactivating efficiency of radiation on different organisms.

Nature 191, 461 (1961)

Thraenhart, O., E. Kuwert
Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung von Chlor und Ozon auf Polioviren bei der Trinkwasseraufbereitung der Stadt Essen.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Orig. B, 160, 305 (1975)

Tichaček, B.
Peressigsäure. In Weuffen, W.: Handbuch der Desinfektion und Sterilisation.

Band 1, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin (1972)

Wallis, C., Y. Czau-Siung, J.L. Melnick
Effect of cations on thermal inactivation of vaccinia, herpes simplex and adenoviruses.

J. Immunol. 89, 41 (1962)

Willinger, H., B. Thiemann
Kritische Beurteilung der Desinfektionswirkstoffe im veterinärhygienischen Bereich.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Orig. B, 156, 145 (1972)

Woese, C.
Thermal inactivation of animal viruses.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 83, 741 (1960)

Woodroofe, G.M.
Heat inactivation of vaccinia virus.

Virology 10, 379 (1960)

## LEBENSLAUF

| | |
|---|---|
| 1953 | 8. August geboren in Mannheim als zweites Kind des Rechtsanwaltes Kurt Kraatz und seiner Ehefrau Marianne, geb. Giesen |
| 1957 | bis 1961 Besuch der Sickinger-Volksschule in Mannheim |
| 1961 | bis 1970 Tulla-Gymnasium in Mannheim mit Abschluß der mittleren Reifeprüfung |
| 1970 | bis 1971 Ausbildung als medizinisch-kaufmännische Assistentin in Freiburg |
| 1971 | bis 1972 Ausübung des Berufes |
| 1972 | bis 1975 Kurpfalz-Gymnasium in Mannheim mit Abitur |
| 1976 | bis 1982 Studium der Tiermedizin an der FU Berlin und der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Staatsexamen am 19. Mai 1982, Approbation als Tierärztin am 24. Juni 1982 |

Herrn Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr möchte ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und für seine Hilfe danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Mahnel für die jederzeit gern gewährte Unterstützung und für wertvolle Hinweise.

HERSTELLUNG:
PROFI-DRUCK
ADALBERTSTR. 10 RG
8000 MÜNCHEN 40
TEL: 39 07 27